

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/083077 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/21, C12P 13/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003694

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 25 日 (25.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-053361 2004 年 2 月 27 日 (27.02.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 橋本 信一 (HASHIMOTO, Shin-ichi). 寺園 浩一 (TERAZONO, Kouichi). 安原 昭典 (YASUHARA, Akinori). 松下一信 (MATSUSHITA, Kazunobu).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING AMINO ACID

(54) 発明の名称: アミノ酸の製造法

(57) Abstract: A microbe obtained by introducing DNA coding for NADH dehydrogenase constituting an NADH dehydrogenase complex wherein the number of proton molecules dischargeable per electron is zero among NADH dehydrogenase complexes acting as a proton pump in an electron transport system of aerobic bacteria. There is further provided an industrially advantageous process for producing an amino acid, characterized in that this microbe is utilized.

(57) 要約: 本発明は、好気性細菌の電子伝達系においてプロトンポンプとして作用する NADH デヒドロゲナーゼ複合体のうち、電子 1 個あたり排出できるプロトン分子数がゼロである NADH デヒドロゲナーゼ複合体を構成する NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られる微生物および該微生物を用いることを特徴とする工業的に有利なアミノ酸の製造法を提供する。



WO 2005/083077 A1

明 細 書

アミノ酸の製造法

技術分野

本発明は、アミノ酸の製造法に関する。

背景技術

近年、微生物の電子伝達系に変異を施し、アミノ酸等の物質の生産性を向上させる試みが報告されている。

例えば、エシェリヒア・コリのエネルギー産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を増幅させるか、またはエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を欠損させることでアミノ酸の生産性が向上することが報告されている（特開 2002-17363 号）。

また、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) において、エネルギー生成効率の高いチトクロム bc オキシダーゼをコードする DNA を増幅することによってリボフラビンの生産性が向上することが報告されている（W003/072785 号）。

電子伝達系における変異が微生物の生育に及ぼす影響について、Molenaar らはコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) の NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を破壊したが、生育等への影響はなかったことを報告している [Journal of Bacteriology, 182, p. 6884-6891 (2000)]。

このように微生物の電子伝達系における変異が、該微生物による物質の生産性に影響を及ぼす可能性のあることが知られているが、どのように影響するかを予測することは難しい。

従来の方法に加えてさらに物質の生産性を向上させる方法の開発が望まれている。

発明の開示

本発明の目的は、工業的に有利なアミノ酸の製造法を提供することにある。

本発明は以下の（１）～（２６）に関する。

（１） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られる微生物を培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物よりアミノ酸を採取することを特徴とするアミノ酸の製造法。

（２） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属およびラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩

基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする、上記（１）の製造法。

（３） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、アゾトバクター・ビネランディー (*Azotobacter vinelandii*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) およびラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする、上記（１）の製造法。

（４） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNAが、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNA、または該塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである、上記（１）の製造法。

（５） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNAが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNAまたは該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAである、上記（１）の製造法。

（６） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記（１）の製造法。

（７） エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNAにコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記（１）の製造法。

(8) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア (Escherichia) 属、コリネバクテリウム属

(Corynebacterium)、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、オーレオバクテリウム (Aureobacterium) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、クラビバクター (Clavibacter) 属、クルトバクテリウム (Curtobacterium) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ピメロバクター (Pimerobacter) 属およびバチルス (Bacillus) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(9) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(10) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア・コリに属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(11) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(12) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)、コリネバクテリウム・フラバム (Corynebacterium flavum)、コリネバクテリウム・ラクトファーメンタム (Corynebacterium lactofermentum) およびコリネバクテリウム・エフィカシス (Corynebacterium efficasis) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(13) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(14) アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-リジン、L-メチオニン、L-トレオニン、L-アルギニン、L-プロリン、L-シトルリン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-セリン、L-システイン、グリシン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニンおよび L-ヒスチジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、上記 (1) ~ (13) いずれか 1 つの製造法。

(15) アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミンおよび L-リジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、上記 (1) ~ (13) いずれか 1 つの製造法。

(16) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウムに属する微生物。

(17) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物。

(18) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、シュードモナス属、アゾトバクター属、サルモネラ属およびラクトバチルス属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(19) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ジフテリア、エシェリヒア・コリ、シュードモナス・フルオレッセンス、アゾトバクター・ビネランディー、サルモネラ・ティフィムリウムおよびラクトバチルス・プラントラムに属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(20) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する DNA、または該塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(21) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(22) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドである、上記 (16) または (17) の微生物。

(23) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA によりコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記 (16) または (17) の微生物。

(24) コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、またはコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh。

(25) エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)。

(26) エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられるエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ（以下、NDH ポリペプチドともいう）は、好気性細菌の電子伝達系においてプロトンポンプとして作用する NADH デヒドロゲナーゼ複合体のうち、電子 1 個あたり排出できるプロトン分子数がゼロである NADH デヒドロゲナーゼ複合体を構成する NADH デヒドロゲナーゼの活性（以下、エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性と略す）を有するポリペプチドであれば、いずれのポリペプチドであってもよい。

NDH ポリペプチドとしては、例えば、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物等に由来する公知の NDH ポリペプチドをあげることができる。

コリネバクテリウム属に属する微生物としては、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*) に属する微生物等をあげることができる。

エシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する微生物としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) に属する微生物等をあげることができる。

シュードモナス属に属する微生物としては、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) に属する微生物等をあげることができる。

アゾトバクター属に属する微生物としては、アゾトバクター・ビネランディー (*Azotobacter vinelandii*) に属する微生物をあげることができる。

サルモネラ属に属する微生物としては、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) に属する微生物をあげることができる。

ラクトバチルス属に属する微生物としては、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に属する微生物をあげることができる。

これらの微生物に由来するNDHポリペプチドとしては、例えば、コリネバクテリウム属に属する微生物に由来する配列番号4または6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、エシェリヒア属に属する微生物に由来する配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、シュードモナス属に属する微生物に由来する配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、アゾトバクター属に属する微生物に由来する配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、サルモネラ属に属する微生物に由来する配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、ラクトバチルス属に属する微生物に由来する配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド等の公知のNDHポリペプチドをあげることができる。

また、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミド pCS-CGndh が有する、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードするDNA (ndh) によりコードされるポリペプチド (以下、NDHポリペプチドAと略す) もNDHポリペプチドとしてあげることができる。

さらに、本発明に用いられるNDHポリペプチドは、エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有していれば、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドの有するアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよい。

NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドの有するアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加があることを意味し、欠失、置換若しくは付加が同時に生じてよい。

置換若しくは付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。

天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドに1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するためには、欠失、置換若しくは付加前のポリペプチドと、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。

BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによ

ってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えば score=50、wordlength=3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

NDHポリペプチドのエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼの活性は、たとえば FEMS Microbiology Letters, 204, 271 (2001) の記載に準じて、エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ、ユビキノーン 1 および NADH を含有する反応液における 275nm または 340nm での吸光度の減少を測定することにより測定することができる。

NDHポリペプチドをコードする DNA としては、エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA であれば、いずれの DNA であってもよい。

NDHポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、NDHポリペプチド A をコードする、エシェリヒア・コリ DH5 α / pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh が有するコリネバクテリウム・グルタミカム由来の NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをそれぞれコードする、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 で表される塩基配列を有する DNA 等の公知の NDHポリペプチドをコードする DNA 等をあげることができる。

本発明に用いられる NDHポリペプチドをコードする DNA は、NDHポリペプチド A または公知の NDHポリペプチドをコードする DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA であってもよい。

NDHポリペプチド A または公知の NDHポリペプチドをコードする DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば、NDHポリペプチド A または公知の NDHポリペプチドをコードする DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA の一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味する。

具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/l の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mmol/l 塩化ナトリウム、15mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、上記BLASTやFASTA等を用いて計算したときに、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と75%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

NDHポリペプチドをコードするDNAは、好気性細菌であって、電子伝達系にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを有する微生物から下記の方法に準じて調製することができる。電子伝達系にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを有する微生物としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム

(Corynebacterium glutamicum)等のコリネバクテリウム(Corynebacterium)属、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、クラビバクター(Clavibacter)属、クルトバクテリウム(Curtobacterium)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、ピメロバクター(Pimerobacter)属に属する微生物等のいわゆるコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)等のエシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)等のシュードモナス(Pseudomonas)属に属する微生物、アゾトバクター・ビネランディー(Azotobacter vinelandii)等のアゾトバクター(Azotobacter)属に属する微生物、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)等のサルモネラ(Salmonella)属に属する微生物、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)等のラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する微生物等をあげることができる。

上記微生物を公知の方法〔例えば、Mol. Microbiol., 20, 833 (1996)に記載の方法〕により培養し、培養後、公知の方法(例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法)により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列をもとに合成したDNAをプライマーとして用い、単離精製された上記微生物の染色体DNAを鋳型としてPCR法[PCR Protocols, Academic Press (1990)]を用いて目的とするDNAを取得することができる。

プライマーとしては、例えば、配列番号3で表される塩基配列を有する、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物の *ndh* の塩基配列をもとに設計した配列番号1および2で表される塩基配列を有するDNAをあげることができる。

また、以下の方法によっても、目的とするDNAを取得することができる。

単離精製した染色体DNAを用いて、モレキュラー・クローニング第3版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法に準じてDNAライブラリーを作製する。

DNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、エシェリヒア・コリ K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、 λ zap II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pBluescript II KS(-)、pBluescript II SK(+) [ストラタジーン社製、Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

DNAを組み込んだベクターをエシェリヒア・コリに属する微生物に導入する。

エシェリヒア・コリに属する微生物としては、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、エシェリヒア・コリ XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、エシェリヒア・コリ C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、エシェリヒア・コリ Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、エシェリヒア・コリ K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、エシェリヒア・コリ JM109 [Gene, 38, 275 (1985)]、エシェリヒア・コリ DH5 α [J. Mol. Biol., 166, 557 (1983)]等をあげることができる。

モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等の実験書に記載されているコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等により、得られたDNAライブラリーから目的とするクローンを取得することができる。

ハイブリダイゼーションに用いるDNAプローブとしては、公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAまたはその一部、公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列をもとに合成し

たDNAなどの他、公知の塩基配列を利用して設計したDNAプライマーを用いてPCRなどにより取得したDNA断片などをあげることができる。

例えば、配列番号3で表される塩基配列を有する、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物のndhの塩基配列をもとに設計した配列番号1および2で表される塩基配列を有するDNAを、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成し、該合成DNAをプライマーとして、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物から取得したDNA断片などを例示することができる。

取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばABI377DNAシーケンサー（パーキン・エルマー社製）等を用いたジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕により、該DNAの塩基配列を決定する。

さらに、決定された塩基配列に基づいたプライマーを調製し、単離精製された染色体DNAを鋳型として、PCR法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕により、目的とするDNAを取得することができる。

また、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

上記のようにして取得される本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhが有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAをあげることができる。該DNAは、NDHポリペプチドAをコードするDNAである。

得られた本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAを宿主微生物に導入することにより、本発明のアミノ酸の製造法に用いられる微生物を作製することができる。

本発明に用いられるポリペプチドコードするDNAを宿主微生物に導入する方法としては、該DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを宿主微生物に導入する方法をあげることができる。

宿主微生物は、好気性細菌であれば特に限定されない。また、該微生物の電子伝達系は、特にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを用いるものでなくてもよい。

宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、

セルロモナス (Cellulomonas) 属、クラビバクター (Clavibacter) 属、クルトバクテリウム (Curtobacterium) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ピメロバクター (Pimerobacter) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラチア (Serratia) 属、エルビニア (Erwinia) 属、バチルス (Bacillus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アナベナ (Anabaena) 属、クロマチウム (Chromatium) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、ロドスピリウム (Rhodospirillum) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、ザイモモナス (Zymomonas) 属等に属する微生物があげられる。

エシェリヒア属に属する微生物としては、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522 等のエシェリヒア・コリに属する微生物をあげることができる。

コリネバクテリウム属に属する微生物としては、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869 等の Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170 等の Corynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870 等の Corynebacterium acetoacidophilum に属する微生物等をあげることができる。

ブレビバクテリウム属に属する微生物としては、Brevibacterium immariophilum、Brevibacterium saccharolyticum、Brevibacterium flavum、Brevibacterium lactofermentum に属する微生物等をあげることができる。

アースロバクター属に属する微生物としては、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis に属する微生物等をあげることができる。

オーレオバクテリウム属に属する微生物としては、Aureobacterium flavescens、Aureobacterium iumsaperdae、Aureobacterium testaceum に属する微生物等をあげることができる。

セルロモナス属に属する微生物としては、Cellulomonas flavigena、Cellulomonas carta に属する微生物等をあげることができる。

クラビバクター属に属する微生物としては、Clavibacter michiganensis、Clavibacterrathayi に属する微生物等をあげることができる。

クルトバクテリウム属に属する微生物としては、Curtobacterium albidum、Curtobacterium iumcitreum、Curtobacterium luteumに属する微生物等をあげることができる。

ミクロバクテリウム属に属する微生物としては、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354 等の Microbacterium ammoniaphilum、Microbacterium lacticum、Microbacterium imperialeに属する微生物等をあげることができる。

ピメロバクター属に属する微生物としては、Pimerobacter simplexに属する微生物等をあげることができる。

エンテロバクター属に属する微生物としては、Enterobacter agglomerans ATCC1228 等の Enterobacter agglomerans、Enterobacter aerogenes、Enterobacter amnigenus、Enterobacter asburiae、Enterobacter cloacae、Enterobacter dissolvens、Enterobacter gergoviae、Enterobacter hormaechei、Enterobacter intermedius、Enterobacter nimipressuralis、Enterobacter sakazakii、Enterobacter tayloraeに属する微生物等をあげることができる。

クレブシエラ属に属する微生物としては、Klebsiella planticolaに属する微生物等をあげることができる。

セラチア属に属する微生物としては、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia entomophila、Serratia grimesii、Serratia proteamaculans、Serratia odorifera、Serratia plymuthica、Serratia rubidaea、Serratia marcescensに属する微生物等をあげることができる。

エルビニア属に属する微生物としては、例えば、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Erwinia cacticida、Erwinia chrysanthemi、Erwinia mallotivora、Erwinia persicinus、Erwinia psidii、Erwinia quercina、Erwinia rhapontici、Erwinia rubrifaciens、Erwinia salicisに属する微生物等をあげることができる。

バチルス属に属する微生物としては、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Bacillus amyloliquefaciens、Bacillus coagulans、Bacillus licheniformis、Bacillus pumilusに属する微生物等をあげることができる。

シュードモナス属に属する微生物としては、Pseudomonas putidaに属する微生物等をあげることができる。

アグロバクテリウム属に属する微生物としては、例えば、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubiに属する微生物等をあげることができる。

アナベナ属に属する微生物としては、例えば、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flosaquaeに属する微生物等をあげることができる。

クロマチウム属に属する微生物としては、例えば、Chromatium buderi、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium warmingii、Chromatium fluviatile に属する微生物等をあげることができる。

ロドバクター属に属する微生物としては、例えば、Rhodobacter capsulatus、Rhodobacter sphaeroides に属する微生物等をあげることができる。

ロドシュードモナス属に属する微生物としては、例えば、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustris に属する微生物等をあげることができる。

ロドスピリウム属に属する微生物としては、例えば、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarum に属する微生物等をあげることができる。

ストレプトマイセス属に属する微生物としては、例えば、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces rameus、Streptomyces tanashiensis、Streptomyces vinaceus に属する微生物等をあげることができる。

ザイモモナス属に属する微生物としては、例えば、Zymomonas mobilis に属する微生物等をあげることができる。

上記宿主微生物のうち、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、アースロバクター属、オーレオバクテリウム属、セルロモナス属、クラビバクター属、クルトバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、ピメロバクター属、エシェリヒア属、またはバチルス属に属する微生物が好ましく用いられ、コリネバクテリウムまたはエシェリヒア属に属する微生物がより好ましく用いられ、コリネバクテリウム属に属する微生物がさらに好ましく用いられる。

宿主微生物への組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主微生物へDNAを導入できる方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭 63-248394）、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

発現ベクターとしては、宿主微生物において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社製）、pHelix1（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）、pKK233-2（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメ

ガ社製)、pQE-8 (キアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭 58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(+)、pBluescript II KS(-) (ストラタジーン社製)、pTrs30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pPAC31 (W098/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭 63-233798)、pCG116、pCG1 (特開平 6-277082)、pCS299P (WO 00/63388) 等があげられる。

プロモーターとしては、宿主微生物中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P_{trp})、lac プロモーター (P_{lac})、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、 P_{SE} プロモーター等の、エシェリヒア・コリに属する微生物やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、SPO2 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を 2 つ直列させたプロモーター、tac プロモーター、lacT7 プロモーター、let I プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

また、宿主微生物がコリネバクテリウム属に属する微生物である場合、P54-6 プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)] もあげられる。バチルス属に属する微生物である場合、xylA プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)] もあげられる。

組換え体 DNA は宿主微生物中で自立複製可能であると同時に、上記プロモーター、リボソーム結合配列、本発明に用いられるポリペプチドをコードする DNA、転写終結配列より構成された組換え体 DNA であることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間は、適当な距離 (例えば 6~18 塩基) を有していることが好ましい。

転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

このような組換え体 DNA としては、例えばエシェリヒア・コリ DH5 α / pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh をあげることができる。

上記方法によって得られる本発明の微生物としては、例えば実施例に示されるコリネバクテリウム・グルタミカム LS-22/pCS-CGndh、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh をあげることができる。

宿主微生物に導入された本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAは、微生物中で組換え体DNA上に存在していてもよいし、染色体上に組み込まれていてもよい。

該DNAを染色体上に組み込む方法としては、例えば、*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*、1996年、2325頁、2339頁、アメリカン・ソサエティー・フォー・マイクロバイオロジー等に記載のファージやトランスポゾンを用いる方法をあげることができる。

本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAを導入して得られる微生物（以下、本発明の微生物と略す）を培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物からアミノ酸を採取することにより、アミノ酸を製造することができる。

アミノ酸に特に限定はなく、L-グルタミン酸、L-グルタミン等の2-オキソグルタル酸から生合成されるアミノ酸、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン等のオキサロ酢酸から生合成されるアミノ酸、L-リジン、L-メチオニン、L-トレオニン等のアスパラギン酸から生合成されるアミノ酸、L-アルギニン、L-プロリン、L-シトルリン等のL-グルタミン酸から生合成されるアミノ酸、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン等のピルビン酸から生合成されるアミノ酸、L-セリン、L-システイン、グリシン等の3-ホスホグリセリン酸から生合成されるアミノ酸、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン等のコリスミ酸から生合成されるアミノ酸、L-ヒスチジン等があげられる。

培養に用いる培地としては、本発明の微生物が資化することのできる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物が生育でき、かつ目的とするアミノ酸の生産が効率的に行なえる培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、本発明の微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種醗酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常、振とう培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行なう。培養温度は15℃～50℃がよく、より好ましくは20℃～45℃である。培養時間は通常5時間～7日間、より好ましくは12時間～4日間である。培養中に必要に応じてpHを3～9に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行なう。

また培養中に必要に応じて、ペニシリンやアンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換え体DNAを用いてDNAを導入した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換え体DNAを用いてDNAを導入した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換え体DNAを用いてDNAを導入した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

培養終了後の培養液から、活性炭を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、結晶化法、沈殿法等の、通常アミノ酸の単離に用いられる方法を単独でまたは組み合わせ、アミノ酸を採取することができる。

以下に実施例を示すが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(1) コリネバクテリウム・グルタミカム LS-22 株をLB培地〔10g/L バクトトリプトン（ディフコ社製）、5g/L イーストエキストラクト（ディフコ社製）および5g/L 塩化ナトリウムを含む培地〕に植菌し、30℃で一晩培養した。培養後、Ei kmannsらの方法〔Microbiol., 140, 1817 (1994)〕に準じて、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

配列番号3で表されるコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 の *ndh* の塩基配列に基いて配列番号1および2で表される塩基配列を有するDNAを合成した。

該DNA（各0.5 μmol/L）をプライマーとし、上記染色体DNA（0.1 μg）を鋳型として、PfuDNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5単位および各200 μmol/LのdNTP（dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP）を含む反応液40 μL中でPCRを行なった。

反応終了後、得られた反応液のうち4 μLをアガロースゲル電気泳動に供し、公知のコリネバクテリウム・グルタミカムの *ndh* に相当する1.9kbの断片が増幅していることを確認した後、残りの反応液と等量のTE〔10mmol/L トリス-塩酸（pH8.0）、1mmol/L エチレンジアミン四酢酸を含有する溶液〕飽和フェノール/クロロフォルム（1vol/1vol）溶液を混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2倍量

の冷エタノールを加えて混合し、 -80°C で30分間放置した。該溶液を遠心分離してDNAを得、該DNAを $20\mu\text{L}$ のTEに溶解した。

該DNA溶解液 $5\mu\text{L}$ とpGEM^R-T Easy vector (プロメガ社製) $0.06\mu\text{g}$ をpGEM^R-T Easy vector systemのライゲーションキット (プロメガ社製) を用いて 16°C で16時間反応させ、ndhを含むDNA断片とpGEM^R-T Easy vectorを連結した。

連結反応後の反応液を用いてエシェリヒア・コリ DH5 α 株を、エレクトロポレーション法 [Nucleic acid Res., 16, 6127-6145 (1988)] によって形質転換した。

得られた形質転換体を、 $100\mu\text{g/mL}$ のアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布し、 30°C で一晩培養した。該寒天培地上に生育したコロニーより常法により従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、pGEM^R-T Easy vectorにコリネバクテリウム・グルタミカムのndhを含むDNA断片が挿入されたプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpT-CGndhと命名した。

プラスミドpT-CGndh $1\mu\text{g}$ を制限酵素KpnIおよびSalIで切断し、得られたDNA断片を含む溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約2kbのDNA断片を分離した。

コリネ型細菌用の発現ベクターであるpCS299P (WO 00/63388) $0.2\mu\text{g}$ を制限酵素KpnIおよびSalIで切断後、得られたDNA断片を含む溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約5.4kbのDNA断片を分離した。

上記で得られたndhを含む約2kbのDNA断片とpCS299Pの切断断片 (約5.4kb) をライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、 16°C で16時間反応させて連結した。

連結反応後の反応液を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム LS-22 株を、エレクトロポレーション法 [Nucleic acid Res., 16, 6127-6145 (1988)] を用いて形質転換した。

得られた形質転換体を $25\mu\text{g/mL}$ のカナマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、 30°C で一日間培養した。該寒天培地上に生育したコロニーより、常法によりプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析して、該プラスミドが、pCS299Pにndhを含むDNA断片が挿入されたプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpCS-CGndhと命名した。

プラスミドpCS-CGndhを含有するエシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndhは、FERM BP-08633として、平成16年2月19日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) に寄託されている。

(2) コリネバクテリウム・グルタミカム LS-22 株およびコリネバクテリウム・グルタミカム LS-22 株にpCS-CGndhを導入したコリネバクテリウム・グルタミカム

LS-22/pCS-CGndh 株をそれぞれ、試験管中の LB 培地 5mL に植菌し、30℃で一晩振とう培養した。

培養液 1mL を 100mL の MG 培地 [10g/L グルコース、3g/L リン酸二水素カリウム、3g/L リン酸水素二カリウム、2g/L 塩化アンモニウム、2g/L 尿素、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、1mg/L 硫酸マンガン・7水和物、30mg/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩、20mg/L システイン塩酸塩、0.5g/L カザミノ酸、および 1mL/L メタルミックス (990mg/L 硫酸鉄・7水和物、880mg/L 硫酸亜鉛・7水和物、393mg/L 硫酸銅・5水和物、72mg/L 塩化マンガン・4水和物、88mg/L 四ホウ酸ナトリウム・10水和物および 37mg/L パラモリブデン酸アンモニウム・4水和物を含有する溶液)を含有する培地] の入った 500mL 容三角フラスコに添加し、30℃で 80 時間、220rpm で振とう培養した。培養後、培養上清のグルタミン酸濃度を HPLC にて定量した。

HPLC 分析は、培養上清を 40℃でカラム AQ-312 (YMC 社製) に供し (移動相: 2.94g/L クエン酸ナトリウム、1.42g/L 硫酸ナトリウム、17mL/L n-プロパノールおよび 3g/L ラウリル硫酸ナトリウムを含有する pH 2.4 の溶液)、反応液 (18.5g/L ホウ酸、11g/L NaOH、0.6g/L オルトフタルアルデヒド、2mL/L メルカプトエタノールおよび 3mL/L Brige-35 を含有する溶液) と混合し、励起波長 345nm、吸収波長 455nm の蛍光分析に供して行った。

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカム LS-22 株が培養液中に 1.5g/L のグルタミン酸を蓄積していたのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカム LS-22/pCS-CGndh 株は 2.3g/L のグルタミン酸を蓄積していた。

実施例 2

実施例 1 と同様に、エレクトロポレーション法を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752 株に pCS-CGndh を導入し、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh 株を得た。

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752 株およびコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh 株を、それぞれ GS 培地 [70g/L グルコース、10g/L コーンステープリカー、10g/L 肉エキス、10g/L 酵母エキス、5g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸二水素カリウム、1.5g/L リン酸水素二カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、10mg/L 硫酸マンガン・7水和物、0.8mg/L 硫酸銅・5水和物、8.3g/L 尿素、5 μ g/L ビオチン、および 1mg/L チアミン塩酸塩を含有し、pH 7.2 の培地] 5mL の入った試験管に植菌し、30℃で 24 時間振とう培養した。

この培養液 2.5mL を 25mL の GP 培地 [116g/L グルコース、4g/L フラクトース、50g/L 塩化アンモニウム、10mg/L ニコチン酸、0.7g/L リン酸二水素カリウム、0.7g/L リン酸水素二カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、20mg/L 硫

酸鉄・10水和物、20mg/L 硫酸マンガン・7水和物、0.8mg/L 硫酸銅・5水和物、5g/L 尿素、0.5 μ g/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩および50g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH 7.2の培地]の入った三角フラスコに添加し、30℃で72時間、220rpmで振とう培養した。

培養後、培養上清中のグルタミンの蓄積量を実施例1に記載したHPLC条件で定量した。

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752株のグルタミンの蓄積量は32.2g/Lであるのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh株のグルタミンの蓄積量は33.3g/Lであった。

実施例3

実施例1と同様に、エレクトロポレーション法を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株にpCS-CGndhを導入し、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株を得た。

コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株およびコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株を、それぞれ、LS培地〔50g/L シュクロース、30g/L コーンステープリカー、20g/L 肉エキス、20g/L カザミノ酸、8g/L 硫酸アンモニウム、2g/L リン酸二水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、3g/L 尿素、20g/L ペプトン、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、10mg/L 硫酸亜鉛・7水和物、20mg/L ニコチン酸、10mg/L パントテン酸カルシウム、0.1mg/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩および10g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH 7.2の培地] 5mLの入った試験管に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。

この培養液0.5mLをLP培地〔100g/L 糖蜜（糖分として）、45g/L 硫酸アンモニウム、3g/L 尿素、0.5g/L リン酸二水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、0.3mg/L ビオチンおよび30g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH7.0の培地] 5mLの入った試験管に添加し、30℃で72時間、220rpmで振とう培養した。培養終了後、培養上清のリジン濃度をHPLCにて定量した。

HPLC分析は、培養上清を、40℃でカラム ODS-80TS (TOSOH 社製)に供し（移動相：2.94g/L クエン酸ナトリウム、1.42g/L 硫酸ナトリウム、300mL/L アセトニトリル、および3g/L ラウリル硫酸ナトリウムを含有するpH 6.0の溶液）、反応液（18.5g/L ホウ酸、11g/L 水酸化ナトリウム、0.6g/L オルトフタルアルデヒド、2mL/L メルカプトエタノールおよび3mL/L Brige-35を含有する溶液）と混合し、励起波長345nm、吸収波長455nmの蛍光分析に供して行った。

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株のリジンの蓄積量は24.8g/Lであったのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株のリジンの蓄積量は28.6g/Lであった。

産業上の利用可能性

本発明により、工業的に有利なアミノ酸の製造法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号 2 ー人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られる微生物を培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物よりアミノ酸を採取することを特徴とするアミノ酸の製造法。
2. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属およびラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であることを特徴とする、請求の範囲第 1 項記載の製造法。
3. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、アゾトバクター・ビネランディー (*Azotobacter vinelandii*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) およびラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であることを特徴とする、請求の範囲第 1 項記載の製造法。
4. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する DNA、または該塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、請求の範囲第 1 項記載の製造法。
5. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA である、請求の範囲第 1 項記載の製造法。
6. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配

列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の製造法。

7. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA にコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の製造法。

8. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム属

(*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、クラビバクター (*Clavibacter*) 属、クルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ピメロバクター (*Pimerobacter*) 属およびバチルス (*Bacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、請求の範囲第1～7項いずれか1項に記載の製造法。

9. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である、請求の範囲第1～7項いずれか1項に記載の製造法。

10. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア・コリに属する微生物である、請求の範囲第1～7項いずれか1項に記載の製造法。

11. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物である、請求の範囲第1～7項いずれか1項に記載の製造法。

12. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・フラバム (*Corynebacterium flavum*)、コリネバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Corynebacterium lactofermentum*) およびコリネバクテリウム・エフィカシス (*Corynebacterium efficasis*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、請求の範囲第1～7項いずれか1項に記載の製造法。

13. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物である、請求の範囲第 1～7 項いずれか 1 項に記載の製造法。

14. アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-リジン、L-メチオニン、L-トレオニン、L-アルギニン、L-プロリン、L-シトルリン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-セリン、L-システイン、グリシン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニンおよび L-ヒスチジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、請求の範囲第 1～13 項いずれか 1 項に記載の製造法。

15. アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミンおよび L-リジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、請求の範囲第 1～13 項いずれか 1 項に記載の製造法。

16. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウム属に属する微生物。

17. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物。

18. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、シュードモナス属、アゾトバクター属、サルモネラ属およびラクトバチルス属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA である、請求の範囲 16 または 17 記載の微生物。

19. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ジフテリア、エシェリヒア・コリ、シュードモナス・フルオレッセンス、アゾトバクター・ビネランディー、サルモネラ・ティフィムリウムおよびラクトバチルス・プランタラムに属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA である、請求の範囲第 16 または 17 項記載の微生物。

20. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する DNA、または該塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA である、請求の範囲第 16 または 17 項記載の微生物。

21. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-

CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA または該 DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA である、請求の範囲第 16 または 17 項記載の微生物。

22. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドである、請求の範囲第 16 または 17 項記載の微生物。

23. エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA によりコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする請求の範囲第 16 または 17 項記載の微生物。

24. コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、またはコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh。

25. エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)。

26. エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh。

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Method for producing amino acid

<130> 1657

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

ctgcttgccc tgcaggtgca ccagcaaacg

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cgagctgcgc gacaaccagg aattcagcgg

30

<210> 3

<211> 1404

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 3

```

atg tca gtt aac cca acc cgc ccc gaa ggc ggc cgt cac cac gtc gtc 48
Met Ser Val Asn Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
  1              5              10              15

gtc atc ggt tct ggt ttt ggt ggc ctt ttt gct gcc aag aac ctg gcc 96
Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Lys Asn Leu Ala
      20              25              30

aag gca gac gtc gat gtc act ctg att gac cgc acc aac cac cac ctc 144
Lys Ala Asp Val Asp Val Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
      35              40              45

ttc cag cca ctg ctg tac caa gtg gca acc ggt atc ctc tcc tcc ggt 192
Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
      50              55              60

gaa atc gca cct tcc act cga cag atc ctg ggc tcc cag gaa aac gtc 240
Glu Ile Ala Pro Ser Thr Arg Gln Ile Leu Gly Ser Gln Glu Asn Val
      65              70              75              80

aac gtc atc aag ggc gaa gtc acc gac atc aac gtc gag tcc cag act 288
Asn Val Ile Lys Gly Glu Val Thr Asp Ile Asn Val Glu Ser Gln Thr
      85              90              95

gtg acc gcc tcc ctg ggc gag ttc acc cgc gtt ttt gag tac gat tcc 336
Val Thr Ala Ser Leu Gly Glu Phe Thr Arg Val Phe Glu Tyr Asp Ser
      100              105              110

ttg gtc gtt ggt gct ggc gca ggt cag tcc tac ttc ggc aat gat cac 384

```

Leu Val Val Gly Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
 115 120 125

ttc gct gag ttc gca cct ggc atg aag tcc atc gac gat gca ctg gag 432
 Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Ser Ile Asp Asp Ala Leu Glu
 130 135 140

att cgt gca cgc atc atc ggt gct ttc gag cgc gct gag atc tgc gag 480
 Ile Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Ile Cys Glu
 145 150 155 160

gat cca gct gag cgc gaa cgc ctg ctc acc ttc gtc gtt gtt ggc gct 528
 Asp Pro Ala Glu Arg Glu Arg Leu Leu Thr Phe Val Val Val Gly Ala
 165 170 175

ggc cca acc ggt gtt gag ctt gct ggc cag ttg gct gag atg gct cac 576
 Gly Pro Thr Gly Val Glu Leu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Met Ala His
 180 185 190

cgc acc ctt gct ggt gag tac aag aac ttc aac acc aac tcc gca aag 624
 Arg Thr Leu Ala Gly Glu Tyr Lys Asn Phe Asn Thr Asn Ser Ala Lys
 195 200 205

atc atc ctg ctt gat ggt gct cca cag gtt ctt cct cca ttc ggt aag 672
 Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
 210 215 220

cgc cta ggc cgc aac gca cag cgc acc ctg gaa aag atg ggt gtc aac 720
 Arg Leu Gly Arg Asn Ala Gln Arg Thr Leu Glu Lys Met Gly Val Asn
 225 230 235 240

gtt cgc ctg aac gct atg gtc acc aac gtt gac gct acc tcg gtc acc 768
 Val Arg Leu Asn Ala Met Val Thr Asn Val Asp Ala Thr Ser Val Thr
 245 250 255

tac aag acc aag gac ggc gaa gag cac acc atc gaa tct ttc tgc aag 816

Tyr Lys Thr Lys Asp Gly Glu Glu His Thr Ile Glu Ser Phe Cys Lys
 260 265 270

att tgg tcc gct ggt gtt gcg gca tcc cca ctg ggc aag ctc gtc gca 864
 Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val Ala
 275 280 285

gag cag acc ggt gtt gag acc gac cgc gca ggc cgc gtc atg gtt aac 912
 Glu Gln Thr Gly Val Glu Thr Asp Arg Ala Gly Arg Val Met Val Asn
 290 295 300

gat gac ctg tct gtt ggc gat cag aag aac gtc ttc gtt gtt ggc gac 960
 Asp Asp Leu Ser Val Gly Asp Gln Lys Asn Val Phe Val Val Gly Asp
 305 310 315 320

atg atg aac tac aac aac ctc cct ggt gtt gct cag gta gca atc cag 1008
 Met Met Asn Tyr Asn Asn Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile Gln
 325 330 335

agt ggt gag tac gtt gct gag cag atc gaa gct gag gtt gaa ggc cgc 1056
 Ser Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Glu Ala Glu Val Glu Gly Arg
 340 345 350

tcc aac acc gag cgc gaa gct ttc gat tac ttc gac aag ggc tcc atg 1104
 Ser Asn Thr Glu Arg Glu Ala Phe Asp Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Met
 355 360 365

gct acc att tcc cgc ttc tcc gca gtg gtg aag atg ggc aag gtt gag 1152
 Ala Thr Ile Ser Arg Phe Ser Ala Val Val Lys Met Gly Lys Val Glu
 370 375 380

gtc acc ggc ttc atc ggt tgg gtt ctg tgg ttg gct gtt cac atc atg 1200
 Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Leu Trp Leu Ala Val His Ile Met
 385 390 395 400

ttc ctg gtt ggc ttc cgc aac cgt ttc gtc tcc gca atc agc tgg ggc 1248

Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Gly
 405 410 415

 ctg aac gca ctg tcc cgc aag cgt tgg aac ctg gca acc acc cgc cag 1296
 Leu Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg Gln
 420 425 430

 cag ctc cac tca cgc acc acg ctg tcc aag ttc gct cac gag ctt gag 1344
 Gln Leu His Ser Arg Thr Thr Leu Ser Lys Phe Ala His Glu Leu Glu
 435 440 445

 gaa gca tct tct gat ctt cca atc gag ctg cgc gac aac cag cgt ttc 1392
 Glu Ala Ser Ser Asp Leu Pro Ile Glu Leu Arg Asp Asn Gln Arg Phe
 450 455 460

 agc gga aag taa 1404
 Ser Gly Lys
 465

 <210> 4
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

 <400> 4
 Met Ser Val Asn Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
 1 5 10 15

 Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Lys Asn Leu Ala
 20 25 30

 Lys Ala Asp Val Asp Val Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
 35 40 45

 Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
 50 55 60

Glu Ile Ala Pro Ser Thr Arg Gln Ile Leu Gly Ser Gln Glu Asn Val
 65 70 75 80

Asn Val Ile Lys Gly Glu Val Thr Asp Ile Asn Val Glu Ser Gln Thr
 85 90 95

Val Thr Ala Ser Leu Gly Glu Phe Thr Arg Val Phe Glu Tyr Asp Ser
 100 105 110

Leu Val Val Gly Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
 115 120 125

Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Ser Ile Asp Asp Ala Leu Glu
 130 135 140

Ile Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Ile Cys Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Ala Glu Arg Glu Arg Leu Leu Thr Phe Val Val Val Gly Ala
 165 170 175

Gly Pro Thr Gly Val Glu Leu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Met Ala His
 180 185 190

Arg Thr Leu Ala Gly Glu Tyr Lys Asn Phe Asn Thr Asn Ser Ala Lys
 195 200 205

Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
 210 215 220

Arg Leu Gly Arg Asn Ala Gln Arg Thr Leu Glu Lys Met Gly Val Asn
 225 230 235 240

Val Arg Leu Asn Ala Met Val Thr Asn Val Asp Ala Thr Ser Val Thr

	245		250		255
Tyr Lys Thr Lys Asp Gly Glu Glu His Thr Ile Glu Ser Phe Cys Lys					
	260		265		270
Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val Ala					
	275		280		285
Glu Gln Thr Gly Val Glu Thr Asp Arg Ala Gly Arg Val Met Val Asn					
	290		295		300
Asp Asp Leu Ser Val Gly Asp Gln Lys Asn Val Phe Val Val Gly Asp					
305		310		315	320
Met Met Asn Tyr Asn Asn Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile Gln					
	325		330		335
Ser Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Glu Ala Glu Val Glu Gly Arg					
	340		345		350
Ser Asn Thr Glu Arg Glu Ala Phe Asp Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Met					
	355		360		365
Ala Thr Ile Ser Arg Phe Ser Ala Val Val Lys Met Gly Lys Val Glu					
	370		375		380
Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Leu Trp Leu Ala Val His Ile Met					
385		390		395	400
Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Gly					
	405		410		415
Leu Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg Gln					
	420		425		430
Gln Leu His Ser Arg Thr Thr Leu Ser Lys Phe Ala His Glu Leu Glu					

435

440

445

Glu Ala Ser Ser Asp Leu Pro Ile Glu Leu Arg Asp Asn Gln Arg Phe

450

455

460

Ser Gly Lys

465

<210> 5

<211> 1362

<212> DNA

<213> Corynebacterium diphtheriae

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 5

atg act aac acc cca ttt cgc cca gaa ggt gga cgc cac cac gtt gta 48

Met Thr Asn Thr Pro Phe Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val

1

5

10

15

gtt att ggc tcc ggc ttc ggt gga cta ttc gca gtt caa aac ctc aaa 96

Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Val Gln Asn Leu Lys

20

25

30

gat gca gat gtc gat atc acc ctc atc gac cgg aca aac cac cac ctt 144

Asp Ala Asp Val Asp Ile Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu

35

40

45

ttc cag ccg ttg ctt tac caa gta gca acc ggt atc ttg tcg tct ggt 192

Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly

50

55

60

gaa atc gca cca caa acg cgt caa gtt ctt gca cag caa aat aat gtg 240

9/45

atc atc ctg ctt gac ggc gct cct cag gtg ctt cca ccg ttc ggc aag 672
 Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
 210 215 220

cgt ttg ggt cgt act gca cag cgt gaa tta gaa aag att ggt gta acg 720
 Arg Leu Gly Arg Thr Ala Gln Arg Glu Leu Glu Lys Ile Gly Val Thr
 225 230 235 240

gtc aag ctg aac gct atc gtt acc ggc gta gac gaa aac tca gtg aca 768
 Val Lys Leu Asn Ala Ile Val Thr Gly Val Asp Glu Asn Ser Val Thr
 245 250 255

tat aag tcc acc gtt gat gat tct ttg cac acg atc gat tcc ttc tgc 816
 Tyr Lys Ser Thr Val Asp Asp Ser Leu His Thr Ile Asp Ser Phe Cys
 260 265 270

aag atc tgg tcg gca ggc gta gcc gct tcc cca cta ggc aaa cta gtt 864
 Lys Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val
 275 280 285

gca gag cag ctt ggt gtc gag gtt gat cgt gca gga cgc gtc cca gtc 912
 Ala Glu Gln Leu Gly Val Glu Val Asp Arg Ala Gly Arg Val Pro Val
 290 295 300

aac gaa gat ctt tct gtt ggc gac gat aag aac gtc ttt gtt att ggc 960
 Asn Glu Asp Leu Ser Val Gly Asp Asp Lys Asn Val Phe Val Ile Gly
 305 310 315 320

gat atg atg tcg ctc aac agg ctt ccg gga gtc gca cag gta gca atc 1008
 Asp Met Met Ser Leu Asn Arg Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile
 325 330 335

caa ggc ggt gaa tac gtt gct gag cag att gct gct ggg gtc gag gga 1056
 Gln Gly Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Ala Ala Gly Val Glu Gly
 340 345 350

cgt tcc tcg tct gaa cgc cca gcc ttt gaa tac tac gac aag ggt tcg 1104
 Arg Ser Ser Ser Glu Arg Pro Ala Phe Glu Tyr Tyr Asp Lys Gly Ser
 355 360 365

atg gct acg gtg tcg cgc ttt aac gcc gtt gtg aag ctt gga aaa gtt 1152
 Met Ala Thr Val Ser Arg Phe Asn Ala Val Val Lys Leu Gly Lys Val
 370 375 380

gaa gtt acg gga ttt att ggc tgg gtc atg tgg ctt ctc gtc cac ttg 1200
 Glu Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Met Trp Leu Leu Val His Leu
 385 390 395 400

atg ttc ttg gtc ggc ttc cgc aac cga gca act gcg gct ttc tct tgg 1248
 Met Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Ala Thr Ala Ala Phe Ser Trp
 405 410 415

ggc atc aat gcg ctt tca cgt aag cgt tgg aac ctc gcc acc act cgt 1296
 Gly Ile Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg
 420 425 430

cag cag ctt cac ggc cgt act ggt ttg caa aaa ctt act gcg ctc gtc 1344
 Gln Gln Leu His Gly Arg Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ala Leu Val
 435 440 445

gat acc gcc gaa aag aag 1362
 Asp Thr Ala Glu Lys Lys
 450

<210> 6

<211> 454

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 6

Met Thr Asn Thr Pro Phe Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
 1 5 10 15

Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Val Gln Asn Leu Lys
 20 25 30

Asp Ala Asp Val Asp Ile Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
 35 40 45

Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
 50 55 60

Glu Ile Ala Pro Gln Thr Arg Gln Val Leu Ala Gln Gln Asn Asn Val
 65 70 75 80

His Val Leu Lys Ala Glu Val Thr Asp Ile Asp Thr Glu Ser Lys Thr
 85 90 95

Val Val Ala Asp Leu Asp Asp Tyr Ser Lys Thr Ile Glu Tyr Asp Ser
 100 105 110

Leu Ile Val Ala Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
 115 120 125

Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Thr Ile Asp Asp Ala Leu Glu
 130 135 140

Leu Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Met Cys Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Lys Glu Arg Glu Arg Leu Leu Thr Phe Val Ile Val Gly Ala
 165 170 175

Gly Pro Thr Gly Val Glu Leu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Met Ala His
 180 185 190

Arg Thr Leu Ser Gly Glu Tyr Thr Gln Phe Thr Pro Ser Asn Ala Lys
 195 200 205

Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
 210 215 220

Arg Leu Gly Arg Thr Ala Gln Arg Glu Leu Glu Lys Ile Gly Val Thr
 225 230 235 240

Val Lys Leu Asn Ala Ile Val Thr Gly Val Asp Glu Asn Ser Val Thr
 245 250 255

Tyr Lys Ser Thr Val Asp Asp Ser Leu His Thr Ile Asp Ser Phe Cys
 260 265 270

Lys Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val
 275 280 285

Ala Glu Gln Leu Gly Val Glu Val Asp Arg Ala Gly Arg Val Pro Val
 290 295 300

Asn Glu Asp Leu Ser Val Gly Asp Asp Lys Asn Val Phe Val Ile Gly
 305 310 315 320

Asp Met Met Ser Leu Asn Arg Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile
 325 330 335

Gln Gly Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Ala Ala Gly Val Glu Gly
 340 345 350

Arg Ser Ser Ser Glu Arg Pro Ala Phe Glu Tyr Tyr Asp Lys Gly Ser
 355 360 365

Met Ala Thr Val Ser Arg Phe Asn Ala Val Val Lys Leu Gly Lys Val
 370 375 380

Glu Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Met Trp Leu Leu Val His Leu
 385 390 395 400

Met Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Ala Thr Ala Ala Phe Ser Trp
 405 410 415

Gly Ile Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg
 420 425 430

Gln Gln Leu His Gly Arg Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ala Leu Val
 435 440 445

Asp Thr Ala Glu Lys Lys
 450

<210> 7

<211> 1302

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 7

ttg act acg cca ttg aaa aag att gtg att gtc ggc ggc ggt gct ggt 48
 Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15

ggg ctg gaa atg gca aca cag ctg ggg cat aag ctg gga cgc aag aaa 96
 Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
 20 25 30

aaa gcc aaa att acg ctg gtc gat cgt aac cac agc cac ctg tgg aaa 144
 Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
 35 40 45

ccg ctg ctg cac gaa gtg gcg act ggc tgc ctt gat gaa ggc gtc gat	192
Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp	
50 55 60	
gcg ttg agc tat ctg gcc cat gcg cgc aat cat ggt ttc cag ttc cag	240
Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln	
65 70 75 80	
ctg ggt tcc gtc att gat att gat cgt gaa gcg aaa aca atc act att	288
Leu Gly Ser Val Ile Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile	
85 90 95	
gca gaa ctg cgc gac gag aaa ggt gaa ctg ctg gtt ccg gaa cgt aaa	336
Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys	
100 105 110	
atc gcc tat gac acc ctg gta atg gcg ctg ggt agc acc tct aac gat	384
Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp	
115 120 125	
ttc aat acg cca ggt gtc aaa gag aac tgc att ttc ctc gat aac ccg	432
Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu Asn Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro	
130 135 140	
cac cag gcg cgt cgc ttc cac cag gag atg ctg aat ttg ttc ctg aaa	480
His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys	
145 150 155 160	
tac tcc gcc aac ctg ggc gcg aat ggc aaa gtg aac att gcg att gtc	528
Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val	
165 170 175	
ggc ggc ggc gcg acg ggt gta gaa ctc tcc gct gaa ttg cac aac gcg	576
Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala	
180 185 190	

gtc aag caa ctg cac agc tac ggt tac aaa ggc ctg acc aac gaa gcc	624
Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Glu Ala	
195 200 205	
ctg aac gta acg ctg gta gaa gcg gga gaa cgt att ttg cct gcg tta	672
Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu	
210 215 220	
ccg cca cgt atc tct gct gcg gcc cac aac gag cta acg aaa ctt ggc	720
Pro Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly	
225 230 235 240	
gtt cgc gtg ctg acg caa acc atg gtc acc agt gct gat gaa ggc ggc	768
Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly	
245 250 255	
ctg cac act aaa gat ggc gaa tat att gag gct gat ctg atg gta tgg	816
Leu His Thr Lys Asp Gly Glu Tyr Ile Glu Ala Asp Leu Met Val Trp	
260 265 270	
gca gcc ggg atc aaa gcg cca gac ttc ctg aaa gat atc ggt ggt ctt	864
Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Gly Gly Leu	
275 280 285	
gaa act aac cgt atc aac cag ctg gtg gtg gaa ccg acg ctg caa acc	912
Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr	
290 295 300	
acc cgc gat cca gac att tac gct att ggc gac tgc gcg tca tgc ccg	960
Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro	
305 310 315 320	
cgt ccg gaa ggg ggc ttt gtt ccg ccg cgt gct cag gct gca cac cag	1008
Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln	
325 330 335	

atg gcg act tgc gca atg aac aac att ctg gcg cag atg aac ggt aag 1056
 Met Ala Thr Cys Ala Met Asn Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
 340 345 350

ccg ctg aaa aat tat cag tat aaa gat cat ggt tgc ctg gta tgc ctg 1104
 Pro Leu Lys Asn Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
 355 360 365

tgc aac ttc tcc acc gtc ggt agc ctg atg ggt aac ctg acg cgc ggc 1152
 Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
 370 375 380

tca atg atg att gaa gga cga att gcg cgc ttt gta tat atc tgc cta 1200
 Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
 385 390 395 400

tac cga atg cat cag att gcg ctg cat ggt tac ttt aaa acc gga tta 1248
 Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

atg atg ctg gtg ggg agt att aac cgc gtt atc cgt ccg cgt ttg aag 1296
 Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

ttg cat 1302
 Leu His

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 8

Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
 20 25 30

Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
 35 40 45

Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp
 50 55 60

Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln
 65 70 75 80

Leu Gly Ser Val Ile Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile
 85 90 95

Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys
 100 105 110

Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp
 115 120 125

Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu Asn Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro
 130 135 140

His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
 165 170 175

Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
 180 185 190

Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Glu Ala
 195 200 205

Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
210 215 220

Pro Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
225 230 235 240

Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
245 250 255

Leu His Thr Lys Asp Gly Glu Tyr Ile Glu Ala Asp Leu Met Val Trp
260 265 270

Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Gly Gly Leu
275 280 285

Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr
290 295 300

Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro
305 310 315 320

Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
325 330 335

Met Ala Thr Cys Ala Met Asn Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
340 345 350

Pro Leu Lys Asn Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
355 360 365

Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
370 375 380

Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
385 390 395 400

Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

Leu His

<210> 9

<211> 1296

<212> DNA

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 9

atg act cat cgt att gtc atc gtt ggc ggc ggc gcc ggc ggt ctg gag 48
 Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Leu Glu
 1 5 10 15

ttg gct acc cgt ctg ggt aag act ctg ggc aag cgt ggc acg gcc agt 96
 Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Leu Gly Lys Arg Gly Thr Ala Ser
 20 25 30

gtg atg ctg gtc gac gcg aac ctg acc cac atc tgg aaa ccg cta ctg 144
 Val Met Leu Val Asp Ala Asn Leu Thr His Ile Trp Lys Pro Leu Leu
 35 40 45

cac gaa gtg gcc gcc ggc tcc ttg aac tcc tcc gaa gac gaa ctc aac 192
 His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Ser Glu Asp Glu Leu Asn
 50 55 60

tat gtc gcc cag gca aaa tgg aac cac ttc gag ttc cag ctc ggg cgc 240

Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn His Phe Glu Phe Gln Leu Gly Arg
 65 70 75 80
 atg agc ggc ctg gat cgc gag cgc aag aga atc caa ctg gcc gcc acc 288
 Met Ser Gly Leu Asp Arg Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ala Ala Thr
 85 90 95
 tat gac gag acc ggc gtc gag ctg ttg ccg gcc cgg gaa ctg ggc tac 336
 Tyr Asp Glu Thr Gly Val Glu Leu Leu Pro Ala Arg Glu Leu Gly Tyr
 100 105 110
 gac acc ctg gtg att gcc gtc ggc agc acc acc aat gac ttc ggc acc 384
 Asp Thr Leu Val Ile Ala Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125
 gaa ggc gcg gcg cag cac tgc ctg ttc ctc gac acc cgc aaa cag gcc 432
 Glu Gly Ala Ala Gln His Cys Leu Phe Leu Asp Thr Arg Lys Gln Ala
 130 135 140
 gag cgc ttc cat cag caa ttc ctg cac cac tat ctg cgc gcc cac gcc 480
 Glu Arg Phe His Gln Gln Leu Leu His His Tyr Leu Arg Ala His Ala
 145 150 155 160
 ggg cag acc gat atc gtc gag cgc atc agc gtc gcc att gtc ggc gcc 528
 Gly Gln Thr Asp Ile Val Glu Arg Ile Ser Val Ala Ile Val Gly Ala
 165 170 175
 ggt gcg acc ggg gtc gaa ctg gcc gcc gag ctg cat aat gcc gcc cac 576
 Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu His Asn Ala Ala His
 180 185 190
 gaa ctg cac gcc tac ggc ctg gac cgg atc aaa ccg gag aac atg cac 624
 Glu Leu His Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Ile Lys Pro Glu Asn Met His
 195 200 205
 atc acc ctg atc gag gcc ggg cca cgc gtc ttg ccg gcc ctg ccg gag 672

Ile Thr Leu Ile Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro Ala Leu Pro Glu
 210 215 220

cgt atc ggc ggg ccg gtg cac aag acc ctg gaa aaa ctc ggg gtc aac 720
 Arg Ile Gly Gly Pro Val His Lys Thr Leu Glu Lys Leu Gly Val Asn
 225 230 235 240

gtc atg acc aac gcc gcc gtc agc cag gtg acc gcc gac agc ctg att 768
 Val Met Thr Asn Ala Ala Val Ser Gln Val Thr Ala Asp Ser Leu Ile
 245 250 255

acc gcg gac ggc aaa gtg atc gac gcg agc ctg aaa gtc tgg gcc gcc 816
 Thr Ala Asp Gly Lys Val Ile Asp Ala Ser Leu Lys Val Trp Ala Ala
 260 265 270

ggg att cgc gcc ccg gac ttc ctc aag gac atc gac ggg ctg gag acc 864
 Gly Ile Arg Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Asp Gly Leu Glu Thr
 275 280 285

aac cgg atc aac cag ttg cac gtg ctg ccc act ttg cag acc acc cgc 912
 Asn Arg Ile Asn Gln Leu His Val Leu Pro Thr Leu Gln Thr Thr Arg
 290 295 300

gac gag aac atc ttc gcc ttc ggc gac tgc gcc gcc tgc ccg caa ccc 960
 Asp Glu Asn Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ala Cys Pro Gln Pro
 305 310 315 320

ggc agc gag cgc aac gtc cca cct cgc gcc cag gcc gca cac cag caa 1008
 Gly Ser Glu Arg Asn Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln
 325 330 335

gcc tca ctg ctg gcc aaa tcc ttg aag ctg cgg atc gag ggc aag gcc 1056
 Ala Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Ile Glu Gly Lys Ala
 340 345 350

ctg ccg gaa tac aaa tac acc gac tac ggc tcg ctg atc tcg ctg tcg 1104

Leu Pro Glu Tyr Lys Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
 355 360 365

cgg ttc tcg gca gtg ggc aac ctg atg ggt aac ctg acc ggc agc gtg 1152
 Arg Phe Ser Ala Val Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Ser Val
 370 375 380

atg ctc gaa ggc tgg ctg gcg cgg atg ttc tat gtg tcg ctg tac cgc 1200
 Met Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Met Phe Tyr Val Ser Leu Tyr Arg
 385 390 395 400

atg cac cag atg gcg ctg tac ggc atg ttc cgc acg gcc atg ttg atg 1248
 Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Met Phe Arg Thr Ala Met Leu Met
 405 410 415

ctg ggt agc aag atc ggg cgt ggg acc gag cct cgg ctg aag ctg cac 1296
 Leu Gly Ser Lys Ile Gly Arg Gly Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 10
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 10
 Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Leu Gly Lys Arg Gly Thr Ala Ser
 20 25 30

Val Met Leu Val Asp Ala Asn Leu Thr His Ile Trp Lys Pro Leu Leu
 35 40 45

His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Ser Glu Asp Glu Leu Asn
 50 55 60

Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn His Phe Glu Phe Gln Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Met Ser Gly Leu Asp Arg Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ala Ala Thr
 85 90 95

Tyr Asp Glu Thr Gly Val Glu Leu Leu Pro Ala Arg Glu Leu Gly Tyr
 100 105 110

Asp Thr Leu Val Ile Ala Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125

Glu Gly Ala Ala Gln His Cys Leu Phe Leu Asp Thr Arg Lys Gln Ala
 130 135 140

Glu Arg Phe His Gln Gln Leu Leu His His Tyr Leu Arg Ala His Ala
 145 150 155 160

Gly Gln Thr Asp Ile Val Glu Arg Ile Ser Val Ala Ile Val Gly Ala
 165 170 175

Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu His Asn Ala Ala His
 180 185 190

Glu Leu His Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Ile Lys Pro Glu Asn Met His
 195 200 205

Ile Thr Leu Ile Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro Ala Leu Pro Glu
 210 215 220

Arg Ile Gly Gly Pro Val His Lys Thr Leu Glu Lys Leu Gly Val Asn
 225 230 235 240

Val Met Thr Asn Ala Ala Val Ser Gln Val Thr Ala Asp Ser Leu Ile
 245 250 255

Thr Ala Asp Gly Lys Val Ile Asp Ala Ser Leu Lys Val Trp Ala Ala
 260 265 270

Gly Ile Arg Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Asp Gly Leu Glu Thr
 275 280 285

Asn Arg Ile Asn Gln Leu His Val Leu Pro Thr Leu Gln Thr Thr Arg
 290 295 300

Asp Glu Asn Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ala Cys Pro Gln Pro
 305 310 315 320

Gly Ser Glu Arg Asn Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln
 325 330 335

Ala Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Ile Glu Gly Lys Ala
 340 345 350

Leu Pro Glu Tyr Lys Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
 355 360 365

Arg Phe Ser Ala Val Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Ser Val
 370 375 380

Met Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Met Phe Tyr Val Ser Leu Tyr Arg
 385 390 395 400

Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Met Phe Arg Thr Ala Met Leu Met
 405 410 415

Leu Gly Ser Lys Ile Gly Arg Gly Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 11

<211> 1296

<212> DNA

<213> *Azotobacter vinelandii*

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 11

atg act cat cgt atc gta atc gtc ggc ggt ggc gct ggc ggc gtg gaa	48
Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Val Glu	
1 5 10 15	
ctc gct acc cgc ctc ggc aag acc atg ggc agg aac ttc cag gcg aag	96
Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Met Gly Arg Asn Phe Gln Ala Lys	
20 25 30	
atc acc ctg gtc gac gcc aac atg acc cac ctg tgg aaa ccg ctg ctg	144
Ile Thr Leu Val Asp Ala Asn Met Thr His Leu Trp Lys Pro Leu Leu	
35 40 45	
cac gaa gtc gcc gcc ggc tcg ctg aac tcg acc ggc gac gaa ctg aac	192
His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Thr Gly Asp Glu Leu Asn	
50 55 60	
tat gtg gcc cag gcc aaa tgg aac aac ttc gag ttc cag tac ggc cgc	240
Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn Asn Phe Glu Phe Gln Tyr Gly Arg	
65 70 75 80	
atg tgc ggt ctg gac cgg gcc aac aag cgt atc cgc ctg gcg gcc cag	288
Met Cys Gly Leu Asp Arg Ala Asn Lys Arg Ile Arg Leu Ala Ala Gln	
85 90 95	
ccg gcc cag gaa gat cgc gcg ccc ctg ccc gag cgc gaa ctg gaa tac	336
Pro Ala Gln Glu Asp Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Glu Leu Glu Tyr	
100 105 110	

gac acc ctg gtc ctt tcc gtc ggc agc acc acc aat gac ttc ggc acc 384
 Asp Thr Leu Val Leu Ser Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125

ccg ggc gcc gcc gag aac tgt att ttc ctg gaa ggc cgc gac cag gcc 432
 Pro Gly Ala Ala Glu Asn Cys Ile Phe Leu Glu Gly Arg Asp Gln Ala
 130 135 140

gag cgt ttc cgc cgt ccg ctg ctc agc cac tac ttg cgt gcc cac gcc 480
 Glu Arg Phe Arg Arg Pro Leu Leu Ser His Tyr Leu Arg Ala His Ala
 145 150 155 160

agc aat gac gac ggc cat cag gtc aag gtc gcc atc gtc ggc gcc ggt 528
 Ser Asn Asp Asp Gly His Gln Val Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
 165 170 175

gcc acc ggg gtc gaa ctg gcc gca gaa ctg cgc cac gcc tcc aag gaa 576
 Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu Arg His Ala Ser Lys Glu
 180 185 190

ctg gtc gcc tat ggg ctg gag cgc att ccg ccg gag aac ctc agc atc 624
 Leu Val Ala Tyr Gly Leu Glu Arg Ile Pro Pro Glu Asn Leu Ser Ile
 195 200 205

acg ctg atc gaa tcc agc ccg cgt gta ctc gcc gcc ctg ccc gaa cgc 672
 Thr Leu Ile Glu Ser Ser Pro Arg Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Arg
 210 215 220

atc agc cgc tcc gcg cac gcc acc ctg gaa agc ctg ggc gtt cgc gtg 720
 Ile Ser Arg Ser Ala His Ala Thr Leu Glu Ser Leu Gly Val Arg Val
 225 230 235 240

ctc gtc agc acc gcc gtc agc gag gtc acc gcg gaa ggc gtg aag acg 768
 Leu Val Ser Thr Ala Val Ser Glu Val Thr Ala Glu Gly Val Lys Thr
 245 250 255

aag gac gac cag ttc atc ccc gcc gac ctc atg gtc tgg gcc gca ggc	816
Lys Asp Asp Gln Phe Ile Pro Ala Asp Leu Met Val Trp Ala Ala Gly	
260 265 270	
gtc cgc gcg ccc gcc ttc ctc aag gag ctg gat ggt ctg gaa acc aat	864
Val Arg Ala Pro Ala Phe Leu Lys Glu Leu Asp Gly Leu Glu Thr Asn	
275 280 285	
cgc atc aac cag ttg cag gtc cgc cag acc ctg cag act act ctg gac	912
Arg Ile Asn Gln Leu Gln Val Arg Gln Thr Leu Gln Thr Thr Leu Asp	
290 295 300	
gac gat atc ttc gcc ttc ggc gat tgt gcc tcc tgc ccg cag ccg ggt	960
Asp Asp Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro Gln Pro Gly	
305 310 315 320	
acc gac cgc ccc gtt ccg ccg cgc gcc cag gcc gct cac cag cag gcc	1008
Thr Asp Arg Pro Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln Ala	
325 330 335	
agc ctg ctg gcc aag tcg ctc cac cgc aag ctg cag gaa gac agc ctc	1056
Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu His Arg Lys Leu Gln Glu Asp Ser Leu	
340 345 350	
tgc tgg agt atc gct aca gcg aac cac ggc tcg ctg atc tcc ctc tcg	1104
Cys Trp Ser Ile Ala Thr Ala Asn His Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser	
355 360 365	
agc ttc tcg gcg atc ggt aac ctg atg ggc aac ctg acc ggc aac gtg	1152
Ser Phe Ser Ala Ile Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Asn Val	
370 375 380	
acc ttg gaa ggc tgg ctg gcc cgc aag ttc tac att tcc ctg tac cgc	1200
Thr Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Lys Phe Tyr Ile Ser Leu Tyr Arg	
385 390 395 400	

atg cac cag atg gcg ctc tac ggt acc ttc cgc acc ctg atg atg atg 1248
 Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Thr Phe Arg Thr Leu Met Met Met
 405 410 415

ctg ggc gac cgc ttc cgc agc agc acc gaa ccc cgc ctc aag ctt cac 1296
 Leu Gly Asp Arg Phe Arg Ser Ser Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 12

<211> 432

<212> PRT

<213> *Azotobacter vinelandii*

<400> 12

Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Val Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Met Gly Arg Asn Phe Gln Ala Lys
 20 25 30

Ile Thr Leu Val Asp Ala Asn Met Thr His Leu Trp Lys Pro Leu Leu
 35 40 45

His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Thr Gly Asp Glu Leu Asn
 50 55 60

Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn Asn Phe Glu Phe Gln Tyr Gly Arg
 65 70 75 80

Met Cys Gly Leu Asp Arg Ala Asn Lys Arg Ile Arg Leu Ala Ala Gln
 85 90 95

Pro Ala Gln Glu Asp Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Glu Leu Glu Tyr
 100 105 110

Asp Thr Leu Val Leu Ser Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125

Pro Gly Ala Ala Glu Asn Cys Ile Phe Leu Glu Gly Arg Asp Gln Ala
 130 135 140

Glu Arg Phe Arg Arg Pro Leu Leu Ser His Tyr Leu Arg Ala His Ala
 145 150 155 160

Ser Asn Asp Asp Gly His Gln Val Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
 165 170 175

Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu Arg His Ala Ser Lys Glu
 180 185 190

Leu Val Ala Tyr Gly Leu Glu Arg Ile Pro Pro Glu Asn Leu Ser Ile
 195 200 205

Thr Leu Ile Glu Ser Ser Pro Arg Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Arg
 210 215 220

Ile Ser Arg Ser Ala His Ala Thr Leu Glu Ser Leu Gly Val Arg Val
 225 230 235 240

Leu Val Ser Thr Ala Val Ser Glu Val Thr Ala Glu Gly Val Lys Thr
 245 250 255

Lys Asp Asp Gln Phe Ile Pro Ala Asp Leu Met Val Trp Ala Ala Gly
 260 265 270

Val Arg Ala Pro Ala Phe Leu Lys Glu Leu Asp Gly Leu Glu Thr Asn
 275 280 285

Arg Ile Asn Gln Leu Gln Val Arg Gln Thr Leu Gln Thr Thr Leu Asp
 290 295 300

Asp Asp Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro Gln Pro Gly
 305 310 315 320

Thr Asp Arg Pro Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln Ala
 325 330 335

Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu His Arg Lys Leu Gln Glu Asp Ser Leu
 340 345 350

Cys Trp Ser Ile Ala Thr Ala Asn His Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
 355 360 365

Ser Phe Ser Ala Ile Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Asn Val
 370 375 380

Thr Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Lys Phe Tyr Ile Ser Leu Tyr Arg
 385 390 395 400

Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Thr Phe Arg Thr Leu Met Met Met
 405 410 415

Leu Gly Asp Arg Phe Arg Ser Ser Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 13

<211> 1302

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium LT2

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 13

ttg act aca cca tta aaa aag atc gtg att gtc ggc ggc ggc gct ggc	48
Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly	
1 5 10 15	
ggg ctg gaa atg gcg acg cag tta ggc cat aaa ctg ggg cgc aag aaa	96
Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys	
20 25 30	
aaa gcg aaa atc acg ctg gta gac aga aat cac agc cat ctg tgg aaa	144
Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys	
35 40 45	
cca ttg ctg cac gaa gtg gcg act ggc tct ctg gac gaa ggc gtg gat	192
Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp	
50 55 60	
gcg ctg agc tat ctg gct cat gcg cgt aat cat ggt ttc cag ttc cag	240
Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln	
65 70 75 80	
ctg ggg tcg gtg atg gat atc gat cgc gaa gcg aaa acc atc acc att	288
Leu Gly Ser Val Met Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile	
85 90 95	
gcc gag ttg cgt gat gaa aag ggc gaa ctg ctg gtg ccg gag cgc aaa	336
Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys	
100 105 110	
atc gcg tat gac acg ctg gtg atg gcg ctg ggc agc acc tct aat gat	384
Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp	
115 120 125	
ttc aac acg ccg ggc gtg aaa gag cac tgt atc ttc ctc gat aac ccg	432
Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu His Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro	
130 135 140	

cat cag gcg cgc cgt ttt cac cag gag atg ctg aac ctg ttc ctc aag 480
His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
145 150 155 160

tat tcg gct aat ctg ggc gcg aac ggt aag gtc aat atc gcc atc gtt 528
Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
165 170 175

ggc ggc ggt gcg acg ggg gtt gag ctg tcg gct gaa ctg cat aat gcg 576
Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
180 185 190

gta aaa cag ctg cat agc tat ggt tat aag ggg ctg acc aac gac gcg 624
Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Asp Ala
195 200 205

ctg aac gtg acg ttg gtt gag gct ggc gag cgt att ctg cct gcg ttg 672
Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
210 215 220

ccg ccg cgt atc tcc agc gcc gcg cat aat gaa ctg acc aaa ctg ggc 720
Pro Pro Arg Ile Ser Ser Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
225 230 235 240

ggt cgc gtg ctg acg caa act atg gtc acc agc gcc gac gaa ggc ggt 768
Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
245 250 255

ctg cat acg aaa gaa ggt gaa tat att cag gcc gat ctg atg gtg tgg 816
Leu His Thr Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Gln Ala Asp Leu Met Val Trp
260 265 270

gcg gcg ggt atc aaa gcg cca gat ttt atg aaa gag att ggt ggt ctg 864
Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Met Lys Glu Ile Gly Gly Leu
275 280 285

gaa acg aac cgc att aac caa ctg gtg gtg gaa ccg acg ctg caa acc	912
Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr	
290 295 300	
acg cgc gat cct gat att tat gcg att ggc gac tgc gct tcc tgc gca	960
Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Ala	
305 310 315 320	
cgt ccg gag gga ggt ttt gtg ccg cct cgc gct cag gcg gcg cat cag	1008
Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln	
325 330 335	
atg gct acc tgc gcg atg aaa aac att ctg gcg cag atg aat ggc aaa	1056
Met Ala Thr Cys Ala Met Lys Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys	
340 345 350	
ccg ctg aaa gct tac cag tat aaa gat cat gga tcg ctg gtc tct ctg	1104
Pro Leu Lys Ala Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu	
355 360 365	
tcc aac ttc tct acc gtg ggt agt ctg atg ggg aac ctg acc cgc ggt	1152
Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly	
370 375 380	
tca atg atg att gaa gga cgt atc gcc cgc ttc gtg tat atc tcg cta	1200
Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu	
385 390 395 400	
tac cgt atg cac cag ata gcg ctg cat gga tac ttt aaa acc ggc ctg	1248
Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu	
405 410 415	
atg atg ctg gtg ggc agt att aac cgc gtc att cgt ccg cgc ctg aaa	1296
Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys	
420 425 430	

ctg cat
Leu His

1302

<210> 14

<211> 434

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium LT2

<400> 14

Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
1 5 10 15

Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
20 25 30

Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
35 40 45

Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp
50 55 60

Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln
65 70 75 80

Leu Gly Ser Val Met Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile
85 90 95

Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys
100 105 110

Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp
115 120 125

Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu His Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro
130 135 140

His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
 165 170 175

Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
 180 185 190

Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Asp Ala
 195 200 205

Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
 210 215 220

Pro Pro Arg Ile Ser Ser Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
 225 230 235 240

Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
 245 250 255

Leu His Thr Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Gln Ala Asp Leu Met Val Trp
 260 265 270

Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Met Lys Glu Ile Gly Gly Leu
 275 280 285

Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr
 290 295 300

Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Ala
 305 310 315 320

Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
 325 330 335

Met Ala Thr Cys Ala Met Lys Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
 340 345 350

Pro Leu Lys Ala Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
 370 375 380

Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
 385 390 395 400

Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

Leu His

<210> 15

<211> 1908

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum WCFS1

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 15

atg gca aag aaa aat att gtc gtt gtc ggt gcg ggg ttt gct ggt gtt 48
 Met Ala Lys Lys Asn Ile Val Val Val Gly Ala Gly Phe Ala Gly Val
 1 5 10 15

tac gca acc aag aaa ctg tct aag cat ttc aaa aaa aat gca gac gtc	96
Tyr Ala Thr Lys Lys Leu Ser Lys His Phe Lys Lys Asn Ala Asp Val	
20 25 30	
gag att acg ttg att gac cgg cat tca tac ttc acg tat atg act gaa	144
Glu Ile Thr Leu Ile Asp Arg His Ser Tyr Phe Thr Tyr Met Thr Glu	
35 40 45	
tta cat gaa gtt gct acc gaa cgg gtg gaa cct gag cat atc caa tat	192
Leu His Glu Val Ala Thr Glu Arg Val Glu Pro Glu His Ile Gln Tyr	
50 55 60	
gat ttg caa cgg ttg ttc gca cgg cga aaa aac gtt cgt ctc gtg acc	240
Asp Leu Gln Arg Leu Phe Ala Arg Arg Lys Asn Val Arg Leu Val Thr	
65 70 75 80	
gat acc gtg acg ggc atc gac aaa aag gca caa aca gtt act acc gaa	288
Asp Thr Val Thr Gly Ile Asp Lys Lys Ala Gln Thr Val Thr Thr Glu	
85 90 95	
cac gga agt tat caa tat gat caa ctt tta att agt ttg ggt ggg gaa	336
His Gly Ser Tyr Gln Tyr Asp Gln Leu Leu Ile Ser Leu Gly Gly Glu	
100 105 110	
tcc aat gac ttt ggg act ccc ggt gtt aag gaa cac ggc ttc gaa ttg	384
Ser Asn Asp Phe Gly Thr Pro Gly Val Lys Glu His Gly Phe Glu Leu	
115 120 125	
tgg tcc ttc gaa caa gcg atg gca ttg cgc gct cac tta tct gca att	432
Trp Ser Phe Glu Gln Ala Met Ala Leu Arg Ala His Leu Ser Ala Ile	
130 135 140	
att cgg cgg ggg gcg gcg gag ctc gac cct gct aag cgc aaa gcc atg	480
Ile Arg Arg Gly Ala Ala Glu Leu Asp Pro Ala Lys Arg Lys Ala Met	
145 150 155 160	

ttg acc ttt aca gtc tgt ggt tct ggt ttt act ggt tct gaa ctg att	528
Leu Thr Phe Thr Val Cys Gly Ser Gly Phe Thr Gly Ser Glu Leu Ile	
165 170 175	
ggt gaa tta atc gaa tat cgt gat gtt ttg gct cga gac aac aag ctc	576
Gly Glu Leu Ile Glu Tyr Arg Asp Val Leu Ala Arg Asp Asn Lys Leu	
180 185 190	
gat cca agt gaa atc acg ctc caa ttg gtc gaa gca gcg ccg act att	624
Asp Pro Ser Glu Ile Thr Leu Gln Leu Val Glu Ala Ala Pro Thr Ile	
195 200 205	
att aac atg ctc aac cgg acg caa gcc ggt aag gcc gct aag tac atg	672
Ile Asn Met Leu Asn Arg Thr Gln Ala Gly Lys Ala Ala Lys Tyr Met	
210 215 220	
gaa aaa cat ggt gtc aaa atc atg acg aac tcc atg att acc gaa gtc	720
Glu Lys His Gly Val Lys Ile Met Thr Asn Ser Met Ile Thr Glu Val	
225 230 235 240	
tgt gaa gac cat gtt aac tta aaa ggc aag gat cca att cca acc tac	768
Cys Glu Asp His Val Asn Leu Lys Gly Lys Asp Pro Ile Pro Thr Tyr	
245 250 255	
acg tta atc tgg aca gcc ggt gtt cgt gct aat agt atc gtt aaa aag	816
Thr Leu Ile Trp Thr Ala Gly Val Arg Ala Asn Ser Ile Val Lys Lys	
260 265 270	
ttc ggc att gaa act aac ccc cgc ggt ggt cgc ttg atg gcc aat gaa	864
Phe Gly Ile Glu Thr Asn Pro Arg Gly Gly Arg Leu Met Ala Asn Glu	
275 280 285	
ttc atg caa gct aag gat tgt aac aat atc ttc tta gcc ggt gat tca	912
Phe Met Gln Ala Lys Asp Cys Asn Asn Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser	
290 295 300	

acc agc tac caa gaa cct gac caa cca cgg cca gtc cca caa atc gtt 960
 Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Asp Gln Pro Arg Pro Val Pro Gln Ile Val
 305 310 315 320

caa ggg gct gaa gaa acc gca gct aag gcc gtc gaa ggt att att aag 1008
 Gln Gly Ala Glu Glu Thr Ala Ala Lys Ala Val Glu Gly Ile Ile Lys
 325 330 335

aac gtt gac cag act gac gtt acg atc aag cca ttt aag ggc gct tat 1056
 Asn Val Asp Gln Thr Asp Val Thr Ile Lys Pro Phe Lys Gly Ala Tyr
 340 345 350

caa gca tcc gtc gac tca att ggt tcc aaa tat gcc gtt gca caa gtt 1104
 Gln Ala Ser Val Asp Ser Ile Gly Ser Lys Tyr Ala Val Ala Gln Val
 355 360 365

tta gag aag tgg aac gtc tct ggt ttt att gcc gtg ctt tta aaa cac 1152
 Leu Glu Lys Trp Asn Val Ser Gly Phe Ile Ala Val Leu Leu Lys His
 370 375 380

gcc atc aac tgg atg tac tac gtt cag att ttc tca ggt tac tac cta 1200
 Ala Ile Asn Trp Met Tyr Tyr Val Gln Ile Phe Ser Gly Tyr Tyr Leu
 385 390 395 400

ttc cag tac ttc atg cac gaa ttc ttc cgg act cgt aat aac cgt aac 1248
 Phe Gln Tyr Phe Met His Glu Phe Phe Arg Thr Arg Asn Asn Arg Asn
 405 410 415

gtc ttc cgc ggt tgg gtc tca cgg gct ggt aac gta ctc tgg agt gtg 1296
 Val Phe Arg Gly Trp Val Ser Arg Ala Gly Asn Val Leu Trp Ser Val
 420 425 430

cca ctg cgg ttc ttc tat ggt gcc atg tgg tta tgg gac tgc tgg act 1344
 Pro Leu Arg Phe Phe Tyr Gly Ala Met Trp Leu Trp Asp Cys Trp Thr
 435 440 445

aaa gtt cag gga tct gaa tcc tgg ttc act gac aag tta cgg tta cca	1392
Lys Val Gln Gly Ser Glu Ser Trp Phe Thr Asp Lys Leu Arg Leu Pro	
450 455 460	
ttc gaa tgg att acc gtg gcc gca acc agt ggt gcc tct caa gca act	1440
Phe Glu Trp Ile Thr Val Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Gln Ala Thr	
465 470 475 480	
aaa gcc gct gca acc agt ggt gct tct gaa gct gcc acg tca acc gtt	1488
Lys Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Val	
485 490 495	
aaa gcc gct aag ggt gtc ttc agt ctt tca tac atg tac ggt aaa gaa	1536
Lys Ala Ala Lys Gly Val Phe Ser Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Lys Glu	
500 505 510	
ccc ctg atg gtc ttt gac aaa atg cca cat tgg ttc gaa tca att acc	1584
Pro Leu Met Val Phe Asp Lys Met Pro His Trp Phe Glu Ser Ile Thr	
515 520 525	
aag gtc ttc att ccg aac atg caa atg gcc ctc ttc ttc cag aaa ttc	1632
Lys Val Phe Ile Pro Asn Met Gln Met Ala Leu Phe Phe Gln Lys Phe	
530 535 540	
atg act tgt gtt gaa atc gtc att gca tta tgt att ttc ttc gga ctc	1680
Met Thr Cys Val Glu Ile Val Ile Ala Leu Cys Ile Phe Phe Gly Leu	
545 550 555 560	
ttt act tgg ttt gct aac gca gtc acc att ggc tta gtt gtc gtc ttc	1728
Phe Thr Trp Phe Ala Asn Ala Val Thr Ile Gly Leu Val Val Val Phe	
565 570 575	
tgc tta tct ggc atg ttc tac tgg gtc aac att tgg atg atc ttt gtt	1776
Cys Leu Ser Gly Met Phe Tyr Trp Val Asn Ile Trp Met Ile Phe Val	
580 585 590	

gcc ctc gcc tta atg aac ggt tcc gga cgg aca ttt ggg tta gac tac 1824
Ala Leu Ala Leu Met Asn Gly Ser Gly Arg Thr Phe Gly Leu Asp Tyr

595

600

605

tgg gtc gtt ccg tgg atg caa aaa cac ctt gga cac tgg tgg tac ggc 1872
Trp Val Val Pro Trp Met Gln Lys His Leu Gly His Trp Trp Tyr Gly

610

615

620

aac gtt cgt tct cat tac gac ggt gtt aaa acc cgc 1908
Asn Val Arg Ser His Tyr Asp Gly Val Lys Thr Arg

625

630

635

<210> 16

<211> 636

<212> PRT

<213> Lactobacillus plantarum WCFS1

<400> 16

Met Ala Lys Lys Asn Ile Val Val Val Gly Ala Gly Phe Ala Gly Val
1 5 10 15

Tyr Ala Thr Lys Lys Leu Ser Lys His Phe Lys Lys Asn Ala Asp Val
20 25 30

Glu Ile Thr Leu Ile Asp Arg His Ser Tyr Phe Thr Tyr Met Thr Glu
35 40 45

Leu His Glu Val Ala Thr Glu Arg Val Glu Pro Glu His Ile Gln Tyr
50 55 60

Asp Leu Gln Arg Leu Phe Ala Arg Arg Lys Asn Val Arg Leu Val Thr
65 70 75 80

Asp Thr Val Thr Gly Ile Asp Lys Lys Ala Gln Thr Val Thr Thr Glu
85 90 95

His Gly Ser Tyr Gln Tyr Asp Gln Leu Leu Ile Ser Leu Gly Gly Glu
 100 105 110

Ser Asn Asp Phe Gly Thr Pro Gly Val Lys Glu His Gly Phe Glu Leu
 115 120 125

Trp Ser Phe Glu Gln Ala Met Ala Leu Arg Ala His Leu Ser Ala Ile
 130 135 140

Ile Arg Arg Gly Ala Ala Glu Leu Asp Pro Ala Lys Arg Lys Ala Met
 145 150 155 160

Leu Thr Phe Thr Val Cys Gly Ser Gly Phe Thr Gly Ser Glu Leu Ile
 165 170 175

Gly Glu Leu Ile Glu Tyr Arg Asp Val Leu Ala Arg Asp Asn Lys Leu
 180 185 190

Asp Pro Ser Glu Ile Thr Leu Gln Leu Val Glu Ala Ala Pro Thr Ile
 195 200 205

Ile Asn Met Leu Asn Arg Thr Gln Ala Gly Lys Ala Ala Lys Tyr Met
 210 215 220

Glu Lys His Gly Val Lys Ile Met Thr Asn Ser Met Ile Thr Glu Val
 225 230 235 240

Cys Glu Asp His Val Asn Leu Lys Gly Lys Asp Pro Ile Pro Thr Tyr
 245 250 255

Thr Leu Ile Trp Thr Ala Gly Val Arg Ala Asn Ser Ile Val Lys Lys
 260 265 270

Phe Gly Ile Glu Thr Asn Pro Arg Gly Gly Arg Leu Met Ala Asn Glu
 275 280 285

Phe Met Gln Ala Lys Asp Cys Asn Asn Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser
 290 295 300

Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Asp Gln Pro Arg Pro Val Pro Gln Ile Val
 305 310 315 320

Gln Gly Ala Glu Glu Thr Ala Ala Lys Ala Val Glu Gly Ile Ile Lys
 325 330 335

Asn Val Asp Gln Thr Asp Val Thr Ile Lys Pro Phe Lys Gly Ala Tyr
 340 345 350

Gln Ala Ser Val Asp Ser Ile Gly Ser Lys Tyr Ala Val Ala Gln Val
 355 360 365

Leu Glu Lys Trp Asn Val Ser Gly Phe Ile Ala Val Leu Leu Lys His
 370 375 380

Ala Ile Asn Trp Met Tyr Tyr Val Gln Ile Phe Ser Gly Tyr Tyr Leu
 385 390 395 400

Phe Gln Tyr Phe Met His Glu Phe Phe Arg Thr Arg Asn Asn Arg Asn
 405 410 415

Val Phe Arg Gly Trp Val Ser Arg Ala Gly Asn Val Leu Trp Ser Val
 420 425 430

Pro Leu Arg Phe Phe Tyr Gly Ala Met Trp Leu Trp Asp Cys Trp Thr
 435 440 445

Lys Val Gln Gly Ser Glu Ser Trp Phe Thr Asp Lys Leu Arg Leu Pro
 450 455 460

Phe Glu Trp Ile Thr Val Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Gln Ala Thr
 465 470 475 480

Lys Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Val
485 490 495

Lys Ala Ala Lys Gly Val Phe Ser Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Lys Glu
500 505 510

Pro Leu Met Val Phe Asp Lys Met Pro His Trp Phe Glu Ser Ile Thr
515 520 525

Lys Val Phe Ile Pro Asn Met Gln Met Ala Leu Phe Phe Gln Lys Phe
530 535 540

Met Thr Cys Val Glu Ile Val Ile Ala Leu Cys Ile Phe Phe Gly Leu
545 550 555 560

Phe Thr Trp Phe Ala Asn Ala Val Thr Ile Gly Leu Val Val Val Phe
565 570 575

Cys Leu Ser Gly Met Phe Tyr Trp Val Asn Ile Trp Met Ile Phe Val
580 585 590

Ala Leu Ala Leu Met Asn Gly Ser Gly Arg Thr Phe Gly Leu Asp Tyr
595 600 605

Trp Val Val Pro Trp Met Gln Lys His Leu Gly His Trp Trp Tyr Gly
610 615 620

Asn Val Arg Ser His Tyr Asp Gly Val Lys Thr Arg
625 630 635

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-2	国際出願番号	PCT/JP 2005/003694
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1657

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	18
1-2	行	30
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2004年 02月 19日 (19.02.2004)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08633
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	萬崎 茂夫

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	17 March 2005
0-5-1	権限のある職員	関 雄一郎

書式8(第7条第1項関係)

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和醗酵工業株式会社
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒100-8185
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli DH5α/pCS-CGndh	(受託番号) FERM BP- 08633
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、2004年2月19日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。 そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	
センター長 岡 修	
Dr.Syuichi Oka, Director	
あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)	
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	

平成 16 年 (04) 2 月 20 日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 1/21, C12P13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 1/21, C12P13/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPLUS (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"Corynebacterium glutamicum ndh gene." Database Ganbank Accession No. AJ238250, 03 December, 2000 (03.12.00), [retrieved on 25 April, 2005 (25.04.05)]	1-20, 22, 25, 26
Y	JP 2002-17361 A (Ajinomoto Co., Inc.), 22 January, 2002 (22.01.02), & US 2002/0160461 A1 & EP 001170376 A1 & AU 005416901 A1 & CN 001335401 A & BR 000102666 A & PL 000348448 A	1-20, 22, 25, 26
Y	Bott M. et al., "The respiratory chain of Corynebacterium glutamicum.", J. Biotechnol., 04 September, 2003 (04.09.03), Vol.104, pages 129 to 153	1-20, 22, 25, 26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April, 2005 (28.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Nantapong N. et al., "Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in <i>Corynebacterium glutamicum</i> KY9714", Appl Microbiol Biotechnol, 2004.12, Vol.66, page 187 to 193	1-26
A	Molenaar D. et al., "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of <i>Corynebacterium glutamicum</i> .", J. Bacteriol., 2000.12, Vol.182, pages 6884-91.	1-26
A	Bjorklof K., "Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of <i>Escherichia coli</i> (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues.", FEBS Lett., Vol.467, No.1, 04 February, 2000 (04.02.00), pages 105 to 110	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 1/21, C12P13/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 1/21, C12P13/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPLUS (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	"Corynebacterium glutamicum ndh gene." Database Genbank Accession No. AJ238250, 2000.12.03 [retrieved on 2005-04-25]	1-20, 22, 25, 26
Y	JP 2002-17361 A (味の素株式会社), 2002.01.22 & US 2002/0160461 A1 & EP 001170376 A1 & AU 005416901 A1 & CN 001335401 A & BR 000102666 A & PL 000348448 A	1-20, 22, 25, 26
Y	Bott M et al., "The respiratory chain of Corynebacterium glutamicum.", J Biotechnol., 2003.09.04, Vol. 104, pp. 129-53	1-20, 22, 25, 26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3 4 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Nantapong N et al., "Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in <i>Corynebacterium glutamicum</i> KY9714.", <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> , 2004.12, Vol. 66, pp.187-93	1-26
A	Molenaar D et al., "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ." , <i>J Bacteriol.</i> , 2000.12, Vol.182, pp.6884-91.	1-26
A	Bjorklof K, "Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of <i>Escherichia coli</i> (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues.", <i>FEBS Lett.</i> , Vol.467, No.1, 2000.02.04, pp.105-10	1-26